

跑台运动对胰岛素抵抗小鼠骨骼肌自噬及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

卢海龙¹ Chun Guang Li² 李佳欣³ 陈小龙³ 王平³

¹浙江经贸职业技术学院公共教育学院体育教研室, 杭州 310018; ²NICM Health Research Institute, Western Sydney University, New South Wales 2145; ³杭州师范大学体育学院, 杭州 311121

通信作者: 王平, Email: 20130007@hznu.edu.cn

【摘要】 目的 观察跑台运动对高脂膳食诱导的胰岛素抵抗 (IR) 小鼠自噬及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路的影响。**方法** 选取 8 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠 24 只, 取其中 8 只小鼠纳入健康对照组 (对照组), 余 16 只小鼠用于建立 IR 模型。对照组小鼠给予普通膳食喂养, 模型组小鼠采用高脂膳食喂养。于造模 12 周后采用随机数字表法将制模成功的 16 只 IR 小鼠分为模型安静组 (模型组) 及跑台运动组 (运动组), 每组 8 只小鼠, 其中模型组及运动组小鼠继续给予高脂膳食喂养, 对照组小鼠则继续给予普通膳食喂养。运动组小鼠以 75% 最大摄氧量 (VO_{2max}) 强度进行跑台运动干预, 持续训练 12 周, 对照组及模型组小鼠不进行运动干预。于 12 周跑台运动结束后, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组小鼠骨骼肌组织病理学改变; 采用酶比色法及酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组小鼠血清甘油三酯 (TC)、胆固醇 (TG) 含量; 采用蛋白免疫印迹法 (WB) 检测各组小鼠骨骼肌组织磷酸化 PI3K (p-PI3K)、磷酸化 Akt (p-Akt)、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、自噬微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3-II)、自噬微管相关蛋白 1 轻链 3-I (LC3-I)、SQSTM1 蛋白 (p62) 及自噬效应蛋白 1 (Beclin-1) 表达变化; 同时采用相关性分析探讨自噬相关蛋白表达与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路间的相关性。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠体重、空腹血糖、血清 TC 及 TG 水平均显著增加 ($P < 0.05$); HE 染色可见小鼠骨骼肌正常细胞数量明显减少, 横纹肌模糊或呈现空泡样改变, 细胞核固缩变小, 肌纤维内部间隙增宽、断裂、结构排列紊乱; 骨骼肌组织 LC3-II、Beclin-1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值均显著降低 ($P < 0.05$), p62、p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 运动组小鼠体重、血糖、血清 TG 及 TC 水平均显著降低 ($P < 0.05$); HE 染色显示小鼠骨骼肌正常细胞数量明显增多, 横纹肌模糊或空泡样改变明显减少, 组织结构排列紊乱程度明显减轻; 骨骼肌组织 LC3-II、LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.05$), p62、p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。通过相关性分析发现, 各组小鼠骨骼肌 LC3-II/LC3-I 比值与 p-mTOR 蛋白表达具有显著负相关性 ($P < 0.05$), Beclin-1 与 p-PI3K 及 p-Akt 蛋白表达亦具有显著负相关性 ($P < 0.05$)。**结论** 有氧跑台运动可有效改善高脂膳食诱导的小鼠骨骼肌病理改变及 IR, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 进而促进自噬活性有关。

【关键词】 高脂膳食; 跑台运动; PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 自噬

基金项目: 浙江省教育厅 2024 年度高等学校国内访问工程师项目 (FG2024169)

DOI: 10.3760/cma.j.cn421666-20250421-00351

Treadmill exercise retards skeletal muscle autophagy in cases of insulin resistance

Lu Hailong¹, Chun Guang Li², Li Jiabin³, Chen Xiaolong³, Wang Ping³

¹Department of Physical Education, School of General Education, Zhejiang Institute of Economics and Trade, Hangzhou 311118, China; ²NICM Health Research Institute, Western Sydney University, New South Wales 2145, Australia;

³School of Physical Education, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311112, China

Corresponding author: Wang Ping, Email: 20130007@hznu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe any effect of treadmill exercise on autophagy and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in insulin-resistant (IR) mice. **Methods** A high-fat diet was used to induce insulin-resistance in 16 8-week-old C57BL/6 mice. Eight additional mice served as the healthy control group fed a normal diet. After 12 weeks the 16 mice were randomly divided into a sedentary group (the model group) and a treadmill exercise group (the exercise group), each of 8. All continued their former diets. The exercise group performed treadmill exercise at 75% of their maximum

oxygen consumption, while the control group and the model group did not. After 12 weeks, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe any pathological changes in the skeletal muscles. Enzyme colorimetry and enzyme-linked immunosorbent assays were employed to detect serum triglyceride (TC) and cholesterol (TG). Western blotting was conducted to detect the expression of phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated Akt (p-Akt), phosphorylated mTOR (p-mTOR), autophagy microtubule-associated protein 1 light chain 3- II (LC3- II), autophagy microtubule-associated protein 1 light chain 3-I (LC3-I), SQSTM1 protein (p62), and autophagy effector protein 1 (Beclin-1) in skeletal muscles. The correlation between the expression of autophagy-related proteins and the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway was quantified. **Results** (1) Compared with the control group, the average body weight, fasting blood glucose, TC and TG of the model group increased significantly. The number of normal cells in the skeletal muscle of the model group was significantly reduced, with blurred or vacuolated striated muscle, condensed and shrunken cell nuclei, widened or broken internal gaps in the muscle fiber, and disordered structure. The expression of LC3- II, Beclin-1 protein and the ratio of LC3- II to LC3- I in the skeletal muscle of the model group had decreased significantly, but the expression of p62, p-PI3K, p-Akt and p-mTOR proteins had increased significantly compared to the control group. (2) Compared with the model group, the body weight, blood glucose, and serum TG and TC of the exercise group decreased significantly. The number of normal cells in the skeletal muscles increased significantly, blurring or vacuolation of the striated muscle was significantly less, and disorder in the tissue structure was significantly alleviated. The expression of LC3- II, LC3- II/LC3- I and Beclin-1 protein in the skeletal muscle increased significantly, on average, while p62, p-PI3K, p-Akt and p-mTOR protein levels decreased significantly. (3) LC3- II/LC3- I in the skeletal muscle of all of the mice was negatively correlated with p-mTOR, and the expression of Beclin-1 was negatively correlated with p-PI3K and p-Akt. **Conclusions** Aerobic treadmill exercise effectively improves insulin resistance and the pathological changes in skeletal muscle, at least in mice. The mechanism may be related to the promotion of autophagy through inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

【Key words】 High-fat diet; Treadmill exercise; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Autophagy

Funding:2024 Domestic Visiting Engineer Program for Higher Education Institutions funded by the Zhejiang Provincial Department of Education (FG2024169)

DOI:10.3760/cma.j.cn421666-20250421-00351

长期高脂膳食可导致胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR),使靶组织摄取及利用葡萄糖的能力下降,机体补偿性增加胰岛素分泌,出现代偿性高胰岛素血症,这也是多种代谢性疾病发生的常见病理机制^[1]。由于 IR 发生比较隐匿、早期不易被发现,随着 IR 进展,诱发 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 或非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 等代谢性疾病的风险显著增加^[2-3],严重威胁人类健康。已有研究发现 IR 发病机制复杂多样,可能涉及炎症、线粒体功能障碍、高胰岛素血症和脂毒性等方面^[4-7]。其中脂毒性是诱导 IR 发生、发展及诱发 T2DM 的重要因素^[8],而高脂肪膳食及身体活动减少是诱导脂毒性 IR、导致 T2DM 及 NAFLD 的重要原因之一^[9]。因此,对于脂毒性诱发 IR 的预防至关重要。

骨骼肌 (约占体重 40% 水平) 是人体代谢最活跃的组织之一,可摄取、氧化机体大量的脂肪酸及葡萄糖^[10-11]。但如果大量游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 及脂滴诱导的脂质中间体在骨骼肌内沉积,可抑制骨骼肌摄取葡萄糖,导致糖代谢紊乱^[12]。相关研究发现,与久坐者相比,运动员在输注甘油三酯期间具有较高的肌肉葡萄糖转运率及糖原合成率^[13],同时运动

也能有效控制肥胖青少年血糖水平^[14],但确切机制仍在探讨。

自噬作为机体的一种适应性保护机制,可吞噬多余、错误折叠或聚集蛋白质、受损细胞器及 DNA 等异常大分子物质,使其在溶酶体中降解,实现细胞代谢需求及细胞器更新,该机制在糖尿病及肝病预防中发挥着重要作用^[15-16]。前期有研究发现,运动是啮齿类动物骨骼肌自噬的一种有效诱导剂^[17];而磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是经典的自噬活性抑制性信号通路。有氧运动能否通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而激活骨骼肌自噬,并进而改善 IR? 目前鲜见报道。基于此,本研究通过观察跑台运动干预对 IR 小鼠骨骼肌自噬相关蛋白及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响,以期为临床优化 IR 康复运动处方提供参考依据。

材料与方法

一、动物与分组

选取 8 周龄无特定病原体级 (specific pathogen-

free, SPF) 雄性 C57BL/6 小鼠 24 只, 体重 22~24 g, 均购自上海斯莱克实验动物中心。所有实验小鼠均饲养在杭州师范大学实验动物中心的屏障环境中(饲养环境符合 GB14925-2010 相关标准要求), 期间小鼠自由进食和饮水。经适应性喂养 1 周后, 取 8 只小鼠给予普通膳食(热卡比: 脂肪占 10%, 碳水化合物占 70%, 蛋白质占 20%) 喂养, 并纳入健康对照组(简称对照组), 余 16 只小鼠给予高脂膳食(热卡比: 脂肪占 60%, 碳水化合物占 20%, 蛋白质占 20%) 喂养以建立 IR 模型^[18-19]。待饲养 12 周建模成功后, 采用随机数字表法将其分为模型安静组(简称模型组)及跑台运动组(简称运动组)。对照组小鼠继续给予普通饲料喂养, 模型组及运动组小鼠则继续给予高脂膳食喂养。

二、主要实验仪器及试剂

1. 主要实验仪器: 包括动物实验跑台(中国北京产)、BioTek Epoch 酶标仪(美国产)、JT-12 型脱水机(中国武汉产)、JB-L6 型包埋机(中国武汉产)、Leica RM 2016 型轮转式病理切片仪(德国产)、奥林巴斯 BX53 型生物显微镜(日本产)、DYY-7C 型电泳仪(中国北京产)、DYCZ-24DN 型电泳槽(中国北京产)、DYCZ-40 型电转仪(中国北京产)及 Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+ 型化学发光凝胶成像系统(美国产)等。

2. 主要实验试剂: 包括胰岛素 ELISA 试剂盒(中国武汉产)、pser473-AKT 一抗、pser2448-mTOR 一抗(美国产)、SQSTM1 蛋白(p62)一抗(德国产)、p-PI3K 一抗、自噬微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule-associated protein 1-light chain 3-II, LC3-II)一抗、溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1)一抗、Beclin1 一抗、 β -actin 一抗(美国产)、羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗体及羊抗小鼠 IgG-HRP 标记抗体(中国北京产)等。

三、运动干预

运动组小鼠给予跑台运动干预。在正式跑台运动前, 先进行 5 d 适应性训练, 第 1~2 天跑台速度为 5 m/min, 坡度 0°, 持续运动 10 min; 第 3~4 天跑台速度为 8 m/min, 坡度 0°, 持续运动 10 min; 第 5 天跑台速度为 12 m/min, 坡度 0°, 持续运动 10 min。正式训练时设置跑台速度为 12 m/min(属于中等强度有氧运动), 坡度 0°, 每次持续运动 60 min, 每周运动 5 d, 共连续运动 12 周^[20]。运动过程中为保证运动强度稳定, 可采用毛刷刺激小鼠, 使其始终保持在跑道前 1/3 区域; 与此同时, 对照组及模型组小鼠则置于静止跑台上。

四、样本采集与处理

为避免最后一次运动影响实验结果, 本研究于最

后一次运动结束后 24 h 取材。取材前, 各组小鼠均禁食过夜 12 h, 然后采用腹腔注射水合氯醛(0.35 ml/100 g 体重) 方式进行麻醉, 经眼眶取血, 静置 30 min(室温)、低温离心机离心 10 min(12000 r/min)后, 将血清分装入冻存管内, 并置于 -80 °C 冰箱中保存, 用于血清生化检测。待取血完成后, 于冰面上迅速分离腓肠肌, 左侧腓肠肌经 4% 多聚甲醛固定后用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色; 右侧腓肠肌经液氮速冻, 然后移入 -80 °C 冰箱中保存, 用于蛋白质印迹法(Western blot, WB)检测。

五、生化指标检测

采用雅培越佳型血糖仪检测小鼠血糖水平; 采用酶比色法检测小鼠血清甘油三酯(triglyceride, TG)及总胆固醇(total cholesterol, TC)含量, 以上检测均严格遵照相应试剂盒说明书进行操作。

六、腓肠肌病理检测

取各组小鼠腓肠肌组织, 经常规脱水、透明、浸蜡、包埋后制备石蜡切片。切片经脱蜡处理后分别行 Harris 氏苏木素染色及 HE 染色, 然后将切片置入无水乙醇中脱水, 经二甲苯透明、风干后采用中性树胶封片。于显微镜下观察各组小鼠腓肠肌 HE 染色情况, 采用 Image J 软件分析 HE 染色切片中异常肌纤维占比及平均横截面积。

七、Western blot 检测

取各组小鼠腓肠肌组织, 将其与裂解液一同置入加有磁珠的研磨管中研磨、冰上裂解, 经离心(4 °C, 12000 rpm 离心 5 min)后取上清液, 采用 BCA(bicinchoninic acid)法进行蛋白定量, 加热使蛋白变性。经制胶、上样、电泳、转膜、封闭、洗涤[用三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液(tris-buffered saline with tween-20, TBST)漂洗 2 min]后, 分别加入一抗稀释液 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、p62、LC3、Beclin1、LAMP1(稀释比均为 1:1000)及 β -actin(稀释比为 1:5000), 置于 4 °C 冰箱内孵育过夜。于次日在室温环境下复温 20~30 min, 经 TBST 洗膜 3 次, 在室温环境下孵育二抗(稀释比为 1:5000)1 h, 经 TBST 洗涤 3 次, 通过凝胶成像系统进行发光显像, 采用 Image J 软件分析各蛋白条带灰度值。目标蛋白相对表达量计算公式如下: 相对表达量 = 目标蛋白灰度值/内参 β -actin 蛋白灰度值。最后以对照组的相对表达量作为基准进行标准化处理, 进而得到各组小鼠目标蛋白的相对表达水平。

八、统计学方法

本研究采用 GraphPad Prism 9.0 版统计学软件包进行处理分析。所有数据分别经 Shapiro-Wilk 检验、*F* 检验及 Brown-Forsythe 检验均符合正态分布且方差齐性, 计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示。三组间比较采用

单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 然后进行 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、干预前、后各组小鼠体重比较

干预前, 各组小鼠体重组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。干预后与对照组比较, 发现模型组小鼠体重显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 发现运动组小鼠体重显著减轻($P < 0.05$), 具体数据见表 1。

表 1 干预前、后各组小鼠体重比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	干预前	干预后
对照组	8	21.27±0.67	25.76±0.90
模型组	8	21.33±0.76	37.27±2.26 ^a
运动组	8	21.47±0.67	31.80±2.07 ^b

注: 与对照组相同时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组相同时间点比较, ^b $P < 0.05$

二、各组小鼠空腹血糖水平比较

经 12 周干预后, 与对照组空腹血糖水平[(4.79±0.49) mmol/L] 比较, 发现模型组小鼠空腹血糖水平[(10.07±1.05) mmol/L] 显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 发现运动组小鼠空腹血糖水平[(7.41±0.50) mmol/L] 则显著下降($P < 0.05$)

三、各组小鼠血清 TG 及 TC 含量比较

经 12 周干预后, 与对照组比较, 发现模型组小鼠 TG 及 TC 含量均显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 发现运动组小鼠 TG 及 TC 含量均显著降低($P < 0.05$), 具体数据见表 2。

表 2 干预后各组小鼠血清 TG 及 TC 含量比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TG 含量	TC 含量
对照组	8	0.79±0.06	4.12±0.18
模型组	8	1.06±0.10 ^a	9.00±0.47 ^a
运动组	8	0.78±0.08 ^b	7.59±0.19 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

四、各组小鼠骨骼肌切片 HE 染色结果比较

通过对比各组小鼠骨骼肌切片 HE 染色发现, 对照组小鼠骨骼肌细胞形态正常、排列整齐, 具有明显横纹, 胞质红染且均匀, 细胞核位于细胞膜下方, 未见细胞核增多现象, 也无纤维组织增生及脂褐素沉积; 与对照组比较, 模型组小鼠的正常形态骨骼肌细胞数量明显减少, 横纹肌较模糊或呈现空泡样改变, 细胞核固缩变小, 肌纤维内部间隙增宽、断裂, 结构排列紊乱; 与模型组比较, 运动组小鼠骨骼肌正常细胞数量明显增多, 横纹肌模糊或空泡样改变明显减少, 组织结构排列紊乱程度明显减轻, 具体情况见图 1。

五、各组小鼠骨骼肌异常肌纤维占比及平均横截面积比较

与对照组比较, 模型组小鼠骨骼肌平均横截面积显著减小($P < 0.05$); 与模型组比较, 运动组小鼠骨骼肌平均横截面积显著增加($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组小鼠骨骼肌异常肌纤维占比显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 运动组小鼠骨骼肌异常肌纤维占比显著降低($P < 0.05$), 具体情况见表 3。

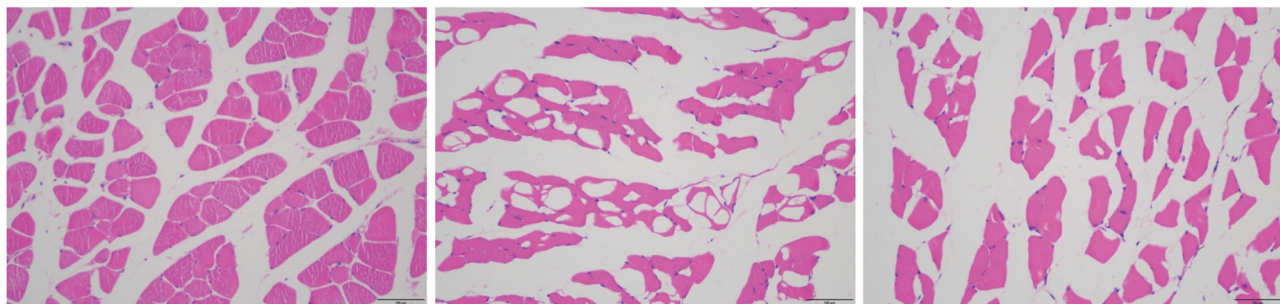
表 3 各组小鼠骨骼肌异常肌纤维占比及肌纤维横截面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	肌纤维横截面积(μm^2)	异常肌纤维占比(%)
对照组	8	938.48±95.73	15.25±4.21
模型组	8	512.88±75.89 ^a	68.25±5.34 ^a
运动组	8	713.61±53.21 ^b	45.59±8.23 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

六、各组小鼠骨骼肌自噬相关蛋白表达比较

与对照组比较, 模型组小鼠骨骼肌 Beclin1 蛋白表达显著降低($P < 0.05$), p62、LC3-II、LAMP1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值均显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 运动组小鼠骨骼肌 Beclin1、LC3-II、LAMP1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值均显著增加($P < 0.05$), p62 蛋白表达则显著降低($P < 0.05$), 具体情况见表 4 及图 2。



对照组

模型组

运动组

图 1 各组小鼠骨骼肌组织形态学比较(HE 染色, $\times 100$)

表 4 各组小鼠骨骼肌 Beclin1、p62、LC3-II、LAMP1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Beclin1	p62	LC3-II	LC3-II/LC3-I	LAMP1
对照组	8	1.00±0.02	1.01±0.01	1.04±0.07	1.03±0.06	0.98±0.02
模型组	8	0.66±0.01 ^a	1.74±0.02 ^a	3.31±0.02 ^a	4.16±0.02 ^a	0.45±0.01 ^a
运动组	8	0.85±0.03 ^b	1.45±0.03 ^b	4.99±0.07 ^b	13.59±0.20 ^b	0.71±0.02 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

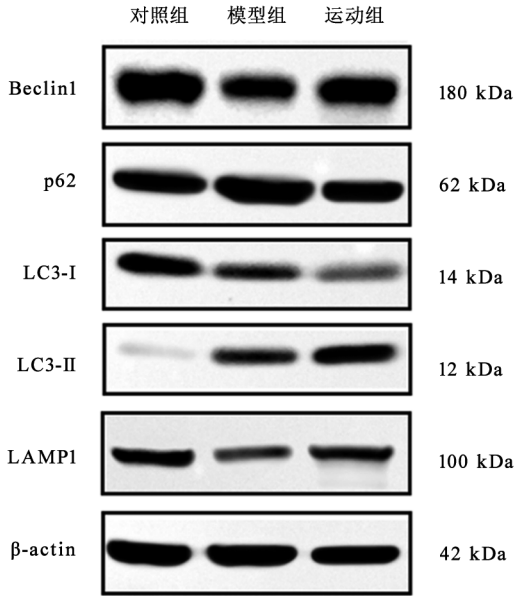


图 2 各组小鼠骨骼肌自噬相关蛋白免疫印迹电泳图对比

p-PI3K 及 p-Akt 蛋白表达亦具有显著负相关性(r 分别为-0.7231 和-0.6670,均 $P<0.05$),具体情况见图 4。

表 5 各组小鼠骨骼肌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	p-PI3K	p-Akt	p-mTOR
对照组	8	1.01±0.02	0.97±0.02	0.98±0.01
模型组	8	1.29±0.05 ^a	1.22±0.11 ^a	1.20±0.04 ^a
运动组	8	0.82±0.24 ^b	0.83±0.03 ^b	0.61±0.02 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

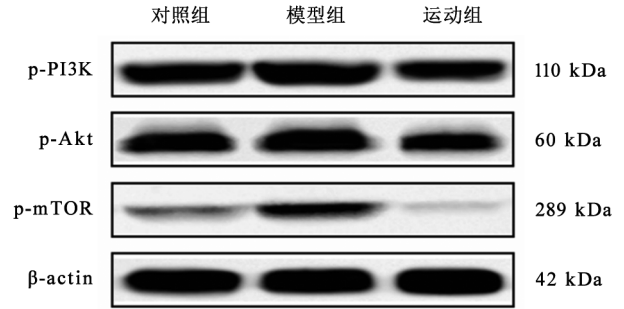


图 3 各组小鼠骨骼肌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白免疫印迹电泳图对比

七、各组小鼠骨骼肌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达比较

与对照组比较,模型组小鼠骨骼肌 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达均显著增加($P<0.05$);与模型组比较,运动组小鼠骨骼肌 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达均显著降低($P<0.05$),具体情况见表 5 及图 3。

八、各组小鼠骨骼肌自噬相关蛋白与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的相关性分析

通过相关性分析发现,各组小鼠骨骼肌 LC3-II/LC3-I 比值与 p-mTOR 蛋白表达具有显著负相关性($r=-0.8132, P<0.05$);各组小鼠骨骼肌 Beclin1 与

讨 论

本研究通过观察与人类 T2DM 自然病程较为接近的 IR 小鼠模型,发现模型组小鼠经高脂膳食喂养 12 周后其病情发展为典型的 IR,同时伴有骨骼肌细胞数量减少、横纹肌破坏、肌纤维结构排列紊乱等异常改变。经 12 周中等强度跑台运动干预后,发现运动组小鼠骨骼肌纤维结构的紊乱程度明显减轻,空腹血糖、

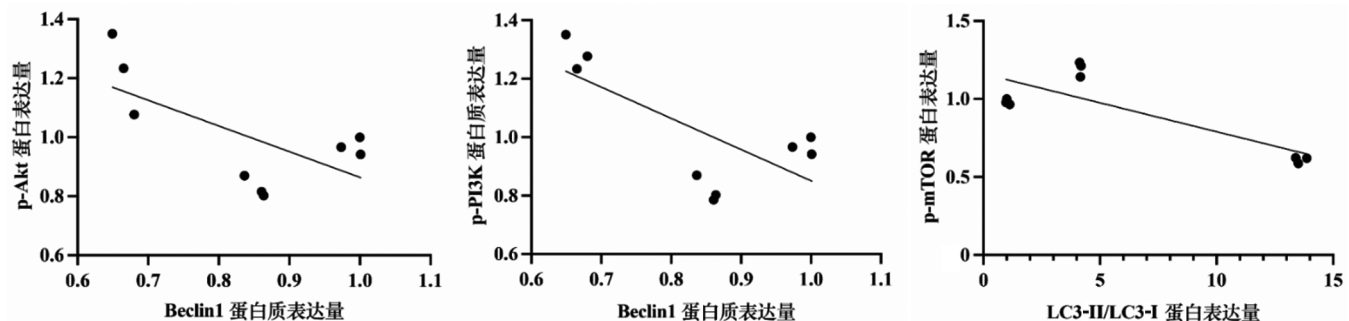


图 4 各组小鼠骨骼肌自噬相关蛋白与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的相关性分析

血清 TG 及 TC 水平也明显下降,其作用机制可能与自噬激活及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路被抑制有关。

自噬作为一种重要的机体代谢保护机制,在真核细胞中高度保守,对于运动适应至关重要^[21]。当机体处于运动^[22]或缺乏营养^[23]时,自噬通量(衡量自噬降解活性的一种标准^[24])增加能提供供能底物及满足细胞代谢的更新需求。骨骼肌是机体中基础自噬通量最高、增加自噬通量能力最强的组织之一^[23],而自噬通量功能依赖于细胞自噬体^[25]。LC3-II/LC3-I 比值是间接反映自噬体形成的关键生化标志物^[26]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠骨骼肌 LC3-II 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值均显著增加,而 12 周跑台运动干预能更显著增加小鼠骨骼肌 LC3-II 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值,提示高脂膳食能在一定程度上增加自噬体含量,而有氧跑台运动干预对上述指标的增加作用更显著。Cheng 等^[27]也报道了游泳训练可增加高脂膳食小鼠骨骼肌 LC3-II/LC3-I 比值。但同时也有研究发现不同结果,如 Fritzen 等^[28]等发现持续 70 min 的单腿膝关节伸展运动能显著降低健康成年男性骨骼肌 LC3-II 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值;另外他们还发现急性跑台运动干预对小鼠骨骼肌 LC3-II 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值无显著影响。为了确定上述指标变化是否由于肌肉运动不足所致,他们采用电刺激反复促使肌肉收缩,结果仍未发现小鼠腓肠肌 LC3-II 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值发生变化^[29]。造成上述研究结果不一致的原因可能与运动强度、运动持续时间、运动后取材时间及实验对象不同等因素有关。同时也提示 LC3-II 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值不能作为反映骨骼肌自噬变化的唯一指标,因此本研究观察指标增加了代表自噬活性特定分子标记物的相关蛋白,如 Beclin1 和 p62^[21] 蛋白表达等,以便于进一步监测运动诱发的自噬活性改变^[29]。

Beclin1 是一种自噬启动因子,参与自噬前体形成,是自噬关键调控蛋白之一^[30]。而 p62 作为自噬受体蛋白,在自噬体形成过程中将 LC3 与聚泛素化蛋白连接起来,并被选择性包裹进入自噬溶酶体内,继而被蛋白水解酶降解,因此 p62 蛋白表达量与自噬活性具有负相关性^[31]。另外,本研究还观察了溶酶体标志物 LAMP1 蛋白表达的变化,其含量水平可反映自噬溶酶体形成及自噬流情况^[32-33]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠骨骼肌 Beclin1 及 LAMP1 蛋白表达均显著降低,p62 蛋白表达明显增加,提示长期高脂膳食诱导的 IR 小鼠其骨骼肌自噬启动功能、降解活性下降,溶酶体活性及自噬溶酶体形成功能均减弱;而跑台运动干预能显著增加 IR 小鼠骨骼肌 Beclin1 及 LAMP1 蛋白表达,显著降低 p62 蛋白表达,提示跑台

运动干预可减弱高脂膳食对自噬启动过程、自噬溶酶体降解过程的抑制作用,有效提高机体自噬活性。

由于自噬过程受多种信号通路调控,其中 PI3K/Akt/mTOR 通路是最经典的信号通路之一^[34],该通路中的 PI3K 能激活丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt,通过一系列调控使 mTOR 发生磷酸化,进而抑制自噬活性^[34-35]。当机体营养供应充足时,PI3K/Akt 信号通路能导致 mTOR 活化,形成的 mTOR 复合体能促进 Unc-51 样激酶 1(UNC-51-like kinase 1,ULK1)及自噬相关蛋白 13(autophagy associated protein 13,ATG13)磷酸化,阻止 ULK1 活化及自噬小体形成,进而抑制自噬功能;当机体营养供应缺乏时,腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)通路被激活,能抑制 mTORC1,解除对 ULK1 的抑制作用,促进 ULK1 磷酸化 ATG13 和 FIP200(FAK-family interacting protein of 200 kDa),加速自噬小体形成并诱导自噬功能增强^[36]。本研究结果显示,跑台运动干预能抑制 IR 小鼠 PI3K、Akt 及 mTOR 蛋白磷酸化,同时还发现跑台运动干预能促进 IR 小鼠骨骼肌自噬相关基因 LC3-II、LC3-II/LC3-I 及 Beclin1 表达增强,降低 p62 蛋白含量,提示高脂膳食诱导的 IR 可激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,抑制自噬,而跑台运动干预能抑制 IR 小鼠骨骼肌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,激活自噬功能。此外,本研究还发现 IR 小鼠骨骼肌 LC3-II/LC3-I 比值与 p-mTOR 蛋白表达具有负相关性,Beclin1 与 p-AKT 及 p-PI3K 蛋白表达亦具有负相关性,提示骨骼肌自噬关键因子与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路密切相关。因此,本研究推测运动干预抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可能是 IR 小鼠骨骼肌自噬活性增强的重要原因,也是跑台运动干预改善 IR 小鼠糖脂代谢紊乱的重要机制之一。

综上所述,长期跑台运动干预能明显增加 IR 小鼠骨骼肌自噬相关基因 LC3-II、Beclin1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值,显著减轻 p62 堆积及骨骼肌组织病理损伤,对高脂膳食诱导的小鼠 IR 具有改善作用,其分子机制可能与抑制骨骼肌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。然而,由于高脂膳食诱导 IR 发病的机制极其复杂,本研究只是初步探讨了跑台运动干预对高脂膳食诱导 IR 的影响机制,可能还存在其他重要的信号通路,有待后续研究进一步深入研究。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Bo T, Gao L, Yao Z, et al. Hepatic selective insulin resistance at the intersection of insulin signaling and metabolic dysfunction-associated

- steatotic liver disease[J]. *Cell Metab*, 2024, 36(5):947-968. DOI: 10.1016/j.cmet.2024.04.006.
- [2] Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. *Nat Med*, 2017, 23(7):804-814. DOI: 10.1038/nm.4350.
- [3] Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(1):3-19. DOI: 10.1007/s00125-002-1009-0.
- [4] Boden G. Free fatty acids and insulin secretion in humans[J]. *Curr Diab Rep*, 2005, 5(3):167-170. DOI: 10.1007/s11892-005-0004-5.
- [5] Gray SL, Donald C, Jetha A, et al. Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic beta-cell leptin signaling[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(9):4178-4186. DOI: 10.1210/en.2010-0102.
- [6] Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(3):364-395. DOI: 10.1210/er.2009-0027.
- [7] Nyawo TA, Pheiffer C, Mazibuko-Mbeje SE, et al. Physical exercise potentially targets epicardial adipose tissue to reduce cardiovascular disease risk in patients with metabolic diseases; oxidative stress and inflammation emerge as major therapeutic targets[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11):1758. DOI: 10.3390/antiox10111758.
- [8] 郝一聪, 李强, 于萍. 脂毒性对胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞功能的影响研究进展[J]. *中国医药*, 2021, 16(8):1258-1260.
- [9] Kwak HB. Exercise and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle[J]. *Integr Med Res*, 2013, 2(4):131-138. DOI: 10.1016/j.imr.2013.09.004.
- [10] Zhang L, Keung W, Samokhvalov V, et al. Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2010, 1801(1):1-22. DOI: doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.09.014.
- [11] Baron AD, Brechtel G, Wallace P, et al. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans[J]. *Am J Physiol*, 1988, 255(6):E769-E774. DOI: 10.1152/ajpendo.1988.255.6.E769.
- [12] Park SS, Seo YK. Excess accumulation of lipid impairs insulin sensitivity in skeletal muscle[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6):1949.
- [13] Phielix E, Begovatz P, Gancheva S, et al. Athletes feature greater rates of muscle glucose transport and glycogen synthesis during lipid infusion[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(21):e129452. DOI: 10.1172/jci.insight.127928.
- [14] Shih KC, Kwok CF. Exercise reduces body fat and improves insulin sensitivity and pancreatic β -cell function in overweight and obese male Taiwanese adolescents[J]. *BMC Pediatr*, 2018, 18(1):80. DOI: 10.1186/s12887-018-1025-y.
- [15] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms[J]. *J Pathol*, 2010, 221(1):3-12. DOI: 10.1002/path.2697.
- [16] Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Autophagy in major human diseases[J]. *Embo J*, 2021, 40(19):e108863. DOI: 10.15252/emboj.2021108863.
- [17] 王平, Li CG, 崔迪, 等. 急性递增负荷跑台运动对小鼠腓肠肌自噬和葡萄糖转运功能的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2021, 40(1):19-28. DOI: 10.16038/j.1000-6710.2021.01.003.
- [18] Wang P, Li J, Li CG, et al. Restoring autophagy by exercise ameliorates insulin resistance partly via calcineurin-driven TFEB nuclear translocation[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2025, 52(3):e70010. DOI: 10.1111/1440-1681.70010.
- [19] 田爱平, 郭赛珊. 胰岛素抵抗的动物模型[J]. *医学研究通讯*, 2004, 33(8):27-28. DOI: 10.3969/j.issn.1673-548X.2004.08.017.
- [20] Fernando P, Bonen A, Hoffman-Goetz L. Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1993, 71(10):854-857. DOI: 10.1139/y93-128.
- [21] Martin-Rincon M, Morales AD, Calbet JA. Exercise-mediated modulation of autophagy in skeletal muscle[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2018, 28(3):772-781. DOI: 10.1111/sms.12945.
- [22] He C, Sumpter R, Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain[J]. *Autophagy*, 2012, 8(10):1548-1551. DOI: 10.4161/auto.21327.
- [23] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3):1101-1111. DOI: 10.1091/mbc.e03-09-0704.
- [24] Loos B, Du TA, Hofmeyr JH. Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality[J]. *Autophagy*, 2014, 10(11):2087-2096. DOI: 10.4161/15548627.2014.973338.
- [25] Elhassan SAM, Candasamy M, Chan EWL, et al. Autophagy and GLUT4: The missing pieces[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(6):1109-1116. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.05.020.
- [26] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8(4):445-544. DOI: 10.4161/auto.19496.
- [27] Cheng F, Dun Y, Cheng J, et al. Exercise activates autophagy and regulates endoplasmic reticulum stress in muscle of high-fat diet mice to alleviate insulin resistance[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 601:45-51. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.02.058.
- [28] Fritzen AM, Madsen AB, Kleinert M, et al. Regulation of autophagy in human skeletal muscle; effects of exercise, exercise training and insulin stimulation[J]. *J Physiol*, 2016, 594(3):745-761. DOI: 10.1113/jp271405.
- [29] Fritzen AM, Frosig C, Jeppesen J, et al. Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle[J]. *Cell Signal*, 2016, 28(6):663-674. DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.03.005.
- [30] Tran S, Fairlie WD, Lee EF. Beclin1: protein structure, function and regulation[J]. *Cells*, 2021, 10(6):1522. DOI: 10.3390/cells10061522.
- [31] Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(33):22847-22857. DOI: 10.1074/jbc.M802182200.
- [32] Solhaug A, Torgersen ML, Holme JA, et al. The fusarium mycotoxin, 2-amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol(AOD) induces vacuolization in HepG2 cells[J]. *Toxicology*, 2020, 433-434:152405. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152405.
- [33] Liang QP, Xu TQ, Liu BL, et al. Sasanquasaponin III from schima crenata Korth induces autophagy through Akt/mTOR/p70S6K pathway and promotes apoptosis in human melanoma A375 cells[J]. *Phytomedicine*, 2019, 58:152769. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.11.029.
- [34] Zhang Q, Zhu H, Xu X, et al. Inactivated sendai virus induces apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(1):64-70. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.130.
- [35] Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1):25-32. DOI: 10.1172/jci73939.
- [36] Sun SY. Enhancing perifosine's anticancer efficacy by preventing autophagy[J]. *Autophagy*, 2010, 6(1):184-185. DOI: 10.4161/auto.6.1.10816.